

Zur Methodik der Aktivitätsbestimmung von Membranenzymen (Acyltransferase und Lysophospholipase)¹⁾

Von E. FERBER, P. G. MUNDER und H. FISCHER

Aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg/Br.

(Eingegangen am 18. März 1966)

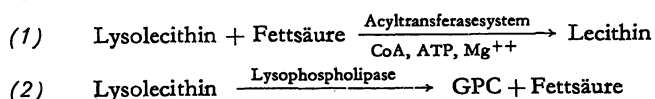
Es wird eine Methode zur direkten Messung von ¹⁴C-markierten, auf Kieselgelpapier getrennten Phospholipiden und Fettsäuren im Flüssigkeitsszintillationszähler beschrieben. Der Umsatz der Membranenzyme Acyltransferase und Lysophospholipase kann mit dieser Methode ermittelt werden. Die Bestimmung der Aktivität dieser Enzyme erfolgt mittels ¹⁴C-markiertem Lysolecithin und ¹⁴C-markierten Fettsäuren. Fehlerquellen beim Arbeiten mit Lysophosphatiden, wie die Adsorption an Glasoberflächen und die Spontanhydrolyse im neutralen Milieu treten besonders unterhalb kritischer Konzentrationen auf. Es werden als Anwendungsbeispiele 1. die Erniedrigung der LL-acylierenden Reaktion in Antikörper-belegten Erythrocyten und 2. die Aktivierung der Lysophospholipase durch Dipyridamol behandelt.

A method is described for the direct measurement of ¹⁴C-phospholipids and ¹⁴C-fatty acids by liquid scintillation counting after their separation on paper impregnated with silicic acid. The activity of the two membrane enzymes, acyltransferase and lysophospholipase, can be determined with this method. The adsorption of lysophosphatides onto glass surfaces and their spontaneous hydrolysis in neutral buffers are sources of error, especially below certain critical concentrations. The application of the method is demonstrated 1. in the partial inhibition of the acyl transferase reaction in sheep erythrocytes coated with anti-Forssmann antibody and 2. in the activation of lysophospholipase by dipyridamol („Persantin“).

Membranenzyme, die Lysophosphatide umsetzen, sind in letzter Zeit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden und gewinnen an allgemein-biologischem und klinischem Interesse.

Nach Verfütterung markierter langkettiger Fettsäuren fanden VAN DEENEN und Mitarbeiter (1), daß reife Erythrocyten diese besonders in Lecithin, zum kleinen Teil auch in Kephalin, einbauen. Als Acceptoren dienen Lysophosphatide, insbesondere Lysolecithin (2, 3).

Unsere Arbeitsgruppe stellte beim Studium der Hämolyse durch LL²⁾ fest, daß diese bei kleinen, eben lytischen Konzentrationen von LL von der Aktivität bestimmter Membranenzyme abhängt (4). — Zwei enzymatische Reaktionen sind es, durch die in menschlichen Erythrocyten LL umgesetzt wird:



Die acylierende Reaktion (1) wurde von LANDS und MERKL (5) in Lebermikrosomen und von OLIVEIRA und VAUGHAN (6) in Erythrocytenstroma gefunden. HEEMSKERK und VAN DEENEN (7) fanden als erste in Kaninchenerythrocyten die Lysophospholipasereaktion (2), durch die LL zu Glycerolphosphorylcholin und Fettsäure abgebaut wird.

Da feststeht, daß die genannten Enzyme nicht auf Erythrocyten beschränkt sind, sondern eine weite Verbreitung haben, und da ferner Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß durch bestimmte Pharmaka, u. a. durch solche, die Transportvorgänge beeinflussen, die Aktivi-

tät dieser Enzyme verändert wird (8), sollen hier einige methodische Voraussetzungen für die Messung dieser Reaktionen kurz geschildert werden.

Methodik

Die Aktivität der Acyltransferase und der Lysophospholipase wurde mit Hilfe markierter Substrate bestimmt. Als markiertes Substrat für die Acyltransferasereaktion verwendeten wir [¹⁴C]-Ölsäure und [¹⁴C]-Palmitinsäure³⁾ und zur Messung der Aktivität der Lysophospholipase [1-Acyl-¹⁴C]-Lysolecithin (Darstellung s. (4)). Die Lipidextrakte der Reaktionsansätze wurden auf Kieselgel-impregniertem Papier⁴⁾ nach MARINETTI (9) getrennt und mit Rhodamin 6G gefärbt. Die Abbildung 1 zeigt schematisch eine solche Trennung.

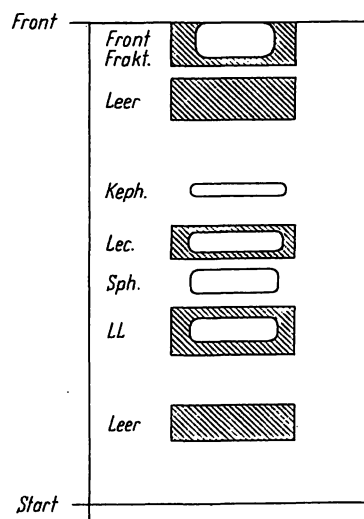


Abb. 1

Schema eines Lipidchromatogramms.

Fließmittel: Diisobutylketon/Essigsäure/Wasser 8:5:1 (v:v:v)
Laufzeit: 3 Stdn./25°; Frontfrakt. = Fettsäuren, Cholesterin, Cholesterinester und Neutralfette

³⁾ Radiochemical Center Amersham, England.

⁴⁾ Kieselgelpapier Nr. 289, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel

¹⁾ Die Trivialnamen Acyltransferase und Lysophospholipase werden hier gebraucht für die Enzyme: Acyl-CoA: Lysolecithin-Acyltransferase und Lysolecithin-Acylhydrolase EC 3115.

²⁾ Abkürzungen: LL = Lysolecithin (Lysophosphatidylcholin); Lec = Lecithin (Phosphatidylcholin); Sph = Sphingomyelin; Keph = Colamin- Kephalin (Phosphatidylaethanolamin); GPC = Glycerolphosphorylcholin.

Da die Aktivität solcher getrennten Fraktionen sehr gering war, konnten die Chromatogramme nicht kontinuierlich mit Hilfe eines Radiopapierchromatographen ausgemessen werden. Sie läßt sich jedoch im Liquid-Scintillationsspektrometer¹⁾ bestimmen. Hierzu wurden die in Abbildung 1 schraffiert dargestellten Zonen (LL, Lec, Frontfraktion und ein oder zwei Papierleerwerte) in 1,5 × 3,5 cm breite Streifen zerschnitten, diagonal in normale Meßgläser gebracht und mit 16 ml Scintillator (5 g 2,5-Diphenyloxazol + 0,3 g 1,4-bis-2(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol in 1000 ml Toluol) im Scintillationsspektrometer gemessen.

Die Gewinnung der Hämolyse und Stromapreparationen ebenso wie die Methoden der Lipidextraktion und Chromatographie wurden an anderer Stelle ausführlich beschrieben (4).

Ergebnisse und Diskussion

Vermeidung von Zählverlusten durch Quencheffekt

Die Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler setzt peinliche Berücksichtigung von Zählverlusten durch Quench voraus. Die sicherste Methode zur Erfassung solcher Verluste ist die Verwendung eines inneren Standards. Wird die Radioaktivität jedoch in einer inhomogenen Probe (wie hier Papierzone im Scintillator) bestimmt, so läßt sich dieses Verfahren nicht anwenden. Für wasserlösliche ¹⁴C- und ³H-markierte, auf Filterpapier aufgetragene Substanzen sind zwar Methoden zur direkten Messung im Scintillationszähler beschrieben (10–14), das Verhalten markierter Phospholipide mußte jedoch zunächst in Vorversuchen geprüft werden. Dabei stellte sich heraus, daß bei der Messung ungefärbter Zonen kein Zählverlust gegenüber der idealen Lösung im Scintillator selbst auftritt (Wirkungsgrad 83%). Wie Tabelle 1 zeigt, tritt jedoch nach Anfärbung mit Rhodamin bei allen analysierten Lipidfraktionen ein erheblicher Quencheffekt ein. (Die Aktivität der nicht gefärbten Fraktionen wurde = 100% gesetzt.)

Tab. 1
Quench durch Anfärben mit Rhodamin 6G.
(Aktivität der nicht gefärbten Fraktionen = 100%)

Auftragsmenge	5 mμMol/2 cm		105 mμMol/2 cm	
	nicht gefärbt	nach Rhodamin-färbung	nicht gefärbt	nach Rhodamin-färbung
Lysolecithin	100	79	100	95
Lecithin	100	78	100	94
Ölsäure	100	50	100	66

Verwendete Lipide: [1-Acyl-¹⁴C]-Lysolecithin und [1,2-Acyl-¹⁴C]-Lecithin aus Leber nach (4) und [1-¹⁴C]-Ölsäure.

Für LL und Lec läßt sich dieser Quencheffekt durch zusätzlichen Auftrag von nicht markierten Lipiden ausgleichen, nicht jedoch der Zählverlust der Ölsäure. Er schwankt bei geringen Änderungen der Fettsäuremenge und der Anfärbung und läßt sich daher nicht durch eine einfache, rechnerische Korrektur ausgleichen. Werden jedoch gemeinsam mit [¹⁴C]-Ölsäure Erythrocytenlipide chromatographiert, die ebenfalls zur Front wandern

(Cholesterin, Cholesterinester, Neutralfette und Fettsäuren), und zwar in Mengen, die aliquoten Teile von 0,05–0,1 ml Sediment/2 cm entsprechen, so ist der Quench völlig aufgehoben (Tab. 2).

Tab. 2
Quench-Verhalten der Ölsäure.
(Aktivität der nicht gefärbten Fraktion = 100%)

	[1- ¹⁴ C]-Ölsäure 1 mμMol/2 cm	[1- ¹⁴ C]-Ölsäure 1 mμMol/2 cm + Frontfraktion
nicht gefärbt	100	100
nach Rhodamin-färbung	58	103

Frontfraktion = Lipidgemisch (s. Abb. 1), aliquoter Teil von 0,05 ml Erythrocytensediment.

Cholesterin allein hebt den Zählverlust nicht auf, so daß entweder eine der anderen Komponenten oder ihre Kombination für diesen Effekt verantwortlich zu machen sind.

Sorgt man dafür, daß nicht kleinere Gesamtmengen an LL und Lec als 100 mμMol (etwa 50–70 μg) und nicht weniger als 0,05 ml Erythrocytensediment bzw. entsprechende Lipidmengen eingesetzt werden, so kann der kleine noch vorhandene Quencheffekt (etwa 2–6%) vernachlässigt werden.

Spontane Hydrolyse von LL

In Chloroform/Methanol bei +4° und auch in wäßrigen Lösungen bei –70° ist LL über mehrere Monate stabil. Bei 37° jedoch wird in wäßriger Lösung bei pH 7 ein Teil der Fettsäure abgespalten. Wie Abbildung 2 zeigt, hängt das Ausmaß der Hydrolyse stark von der Konzentration von LL ab. So sind bei einer Konzentration von 10 mμMol/ml (= 5 μg/ml) nach 3 Std. 30% des LL gespalten, während bei 50 mμMol/ml nur 12% hydrolysiert sind.

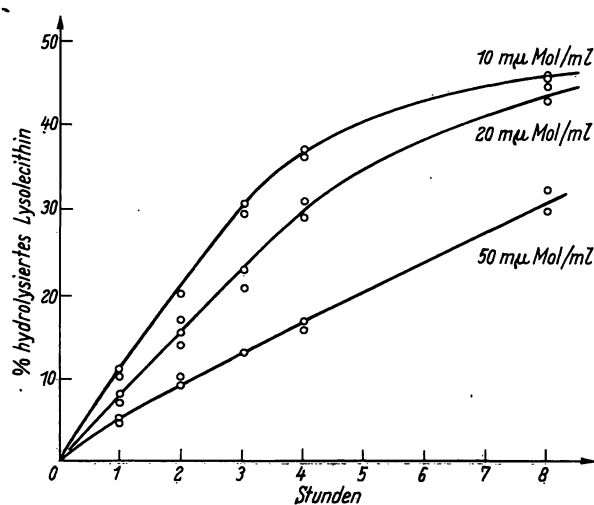


Abb. 2

Spontane Hydrolyse von Lysolecithin.

Reaktionsbedingungen: In 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 waren 10–50 mμMol [1-Acyl-¹⁴C]-LL gelöst; Inkubation bei 37°; anschließend Extraktion und Chromatographie wie beschrieben.

$$\text{Hydrolyserate in \%} = \frac{\text{Aktivität der freigesetzten Fettsäure}}{\text{Gesamtaktivität}} \times 100$$

¹⁾ Tricarb Serie 3000, Fa. Packard Instr. Co., La Grange, Ill. USA.

Dieses Verhalten beruht wahrscheinlich auf der Bildung von Micellen. Die Hydrolyse kommt zum Stillstand (teils in der Abbildung nicht dargestellt), wenn etwa 50% des LL gespalten sind. Die Ursache hierfür ist noch nicht bekannt. Da es bei unseren Reaktionsbedingungen jedoch unwahrscheinlich ist, daß eine meßbare Rückreaktion stattfindet, prüfen wir z. Z. die Frage, ob evtl. die Spaltprodukte (Fettsäure und GPC) einen stabilisierenden Effekt auf LL ausüben.

Adsorption von LL an Glasoberflächen

Beim Arbeiten mit wäßrigen Lösungen von Lysophosphatiden in geringen Konzentrationen ist neben der Spontanhydrolyse die Adsorption an Glasoberflächen als mögliche Fehlerquelle zu beachten. Wie Abbildung 3 zeigt, werden bei Konzentrationen von 20 m μ Mol/ml (= 10 μ g/ml) 50% des LL an der Glaswand adsorbiert. Unter unseren Versuchsbedingungen tritt eine Sättigung erst bei etwa 100 m μ Mol/ml ein. Enthält der Ansatz jedoch Erythrocyten (10-proz. Suspension), so werden bei Verwendung der gleichen Konzentrationen etwa 95% des eingesetzten LL an die Erythrocyten gebunden; die restlichen 5% verteilen sich auf freies und an Glas adsorbiertes LL.

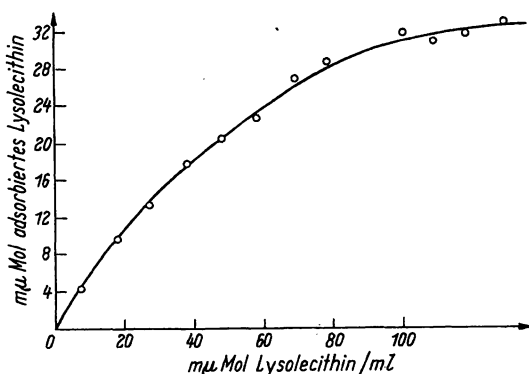


Abb. 3

Adsorption von Lysolecithin an Glasoberflächen.

Jeder Ansatz enthielt in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 7–107 m μ Mol [1-Acyl-¹⁴C]-LL; Inkubation 5 Min./25°; Ø der Reagenzgläser = 17 mm

Enzymaktivität in Vollhämolysat und Stroma

Acyltransferase und Lysophospholipase sind stroma-gebunden (4) und werden am besten im Hämolysat bestimmt. Die größten Enzymaktivitäten werden in „Vollhämolysat“ gemessen, in dem beide Reaktionen etwa 10mal schneller verlaufen als in intakten Erythrocyten. Dialysiert man „Vollhämolysat“, das durch dreimaliges Gefrieren und Tauen von Erythrocytensediment hergestellt wurde, 24 Std. bei 4° gegen 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,4, so wird, wie Tabelle 3 zeigt, besonders stark die Lysophospholipase inaktiviert. In isolierten Stroma-Präparationen ist die Aktivität der Enzyme, wie früher gezeigt wurde (4), um so geringer, je häufiger sie gewaschen wurden. Aber auch die Methode des Zellaufschlusses (Gefrierhämolysat, osmotische Hämolysat) hat starken Einfluß auf die Aktivität der Enzyme (Tab. 3).

Tab. 3

Enzymaktivität in verschiedenen Membranpräparationen menschlicher Erythrocyten.

Werte in m μ Mol umgesetzten LL/ml Ery.-Sed. x Min.

	Lysophospholipase	Acyltransferase
Gefrier-dialysiert	5,0	2,4
Vollhämolysat nicht dialysiert	44,0	4,0
Gefrierstroma	2,0	3,0
Osmotisches Stroma	1,0	1,0

Jeder Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml: 55 m μ Mol [1-Acyl-¹⁴C]-LL; 40 m μ Mol Ölsäure; 56 m μ Mol CoA; 10 μ Mol ATP; 10 μ Mol MgCl₂; 65 μ Mol Phosphatpuffer pH 7,4; 0,1 ml Hämolysat = aliquot von 0,01 ml Ery.-Sed.; Inkubation 30 Min./37°.

Beide Präparationen wurden so gewonnen, daß ein Teil Erythrocytensediment mit 10 Teilen Wasser gemischt, das Stroma durch 30 Min. Zentrifugieren bei 34800 g gewonnen und im Ausgangsvolumen mit 0,1 M Phosphatpuffer resuspendiert wurde. Der einzige Unterschied beider Präparate bestand darin, daß bei der Gewinnung von „Gefrierstroma“ zu Beginn die Erythrocyten durch 3maliges Gefrieren und Tauen hämolysiert wurden, während beim osmotischen Stroma die Hämolysat lediglich durch destilliertes Wasser erfolgte. Wie die Tabelle 3 zeigt, findet man im „Gefrierstroma“, das mikroskopisch aus stärker rupturierten Zellhüllen besteht, eine höhere Aktivität der Lysophospholipase und der Acyltransferase als im „osmotischen“ Stroma.

Anwendungsbeispiele

Aktivierung der Lysophospholipase (Reaktion (2)) durch Pharmaka

An anderer Stelle (8) wurde kurz mitgeteilt, daß Dipyridamol („Persantin“) die Lysophospholipase von Erythrocyten aktiviert. Wir wählten Persantin, da seine permeabilitätsändernden Wirkungen durch die Untersuchungen von GERLACH und DEUTICKE (15, 16) eingehend beschrieben wurden. An dieser Stelle soll ein solcher Versuch als Beispiel für die Bestimmung der Aktivität der Membranenzyme dargestellt werden. Tabelle 4 gibt die Anfangsgeschwindigkeiten der Re-

Tab. 4

Wirkung von Dipyridamol auf die Aktivität der Lysophospholipase Werte in m μ Mol umgesetzten LL/ml Ery.-Sed.

Inkub.-dauer (Min.)	Kontrolle	Dipyridamol (0,1 μ Mol/ml)	% Aktivierung (Kontrolle = 100%)
10	144	408	283
20	272	678	249

Der Reaktionsansatz enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml: 55 m μ Mol [1-Acyl-¹⁴C]-LL; 10 μ Mol MgCl₂; 65 μ Mol Phosphatpuffer pH 7,4; 0,025 ml dialysiertes Hämolysat (human).

aktion (2) in menschlichem Hämolyolat wieder. Unter Dipyridamol ist sofort — ohne Vorinkubation — die Reaktionsgeschwindigkeit fast 3 mal so hoch wie in der Kontrolle.

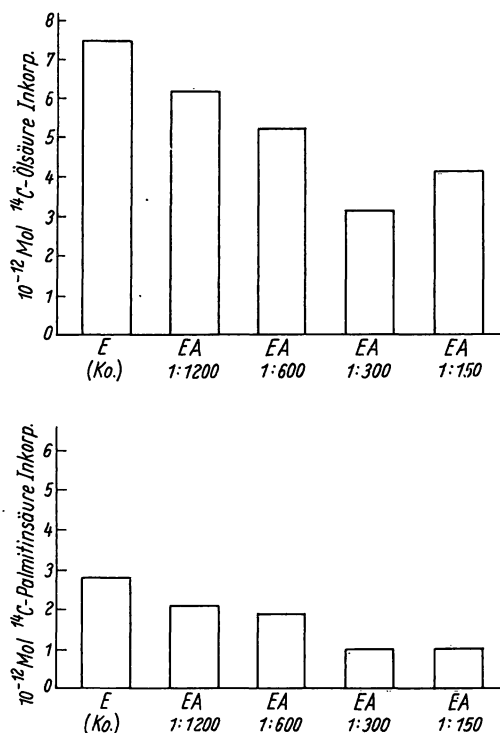


Abb. 4 und 5

Inkorporation von $[^{14}\text{C}]$ -Fettsäuren in Antikörper-belegte Hammelerythrocyten (EA-Zellen).

Herstellung Antikörper-belegter Hammelerythrocyten: 30 ml 15-proz. Hammelerythrocytensuspension wurden mit 30 ml Amboceptorverdünnung (1:150 bis 1:1200) 30 Min./37° inkubiert. Nach der Inkubation 3 mal Waschen der Zellen mit phys. Kochsalzlösung. Reaktionsansatz: Jeder Ansatz enthielt in einem Endvol. von 1,0 ml (Pillemer-Puffer): 0,5 m μ Mol $[^{14}\text{C}]$ -Ölsäure oder $[^{14}\text{C}]$ -Palmitinsäure; 2,5 m μ Mol LL; 0,1 ml Sediment; Inkubation 120 Min./37°

Aus noch nicht abgeschlossenen Versuchen geht hervor, daß eine ähnliche Beschleunigung des Lysolecithinabbaus durch einige antiphlogistisch wirkende Substanzen hervorgerufen wird (17).

Aktivität der Acyltransferase (Reaktion (1)) in Antikörper-beladenen Zellen

Werden Hammelerythrocyten mit käuflichem Amboceptor¹⁾ (Anti-Forssmann-Antikörper) in Verdünnungen von 1:150 bis 1:1200 sensibilisiert, so sind sie gegenüber LL empfindlicher als nicht sensibilisierte Zellen (4). Um zu prüfen, ob diese Labilisierung durch eine Hemmung der Acyltransferase oder der Lysophospholipase hervorgerufen wird, bestimmten wir die Aktivität beider Enzyme in intakten Erythrocyten.

Die Messung der Reaktion (2) mit Hilfe von ^{14}C -LL zeigte, daß die Lysophospholipaseaktivität nicht verändert ist. Die Acyltransferasereaktion (1) ist bei dieser Versuchsanordnung (mit markiertem LL) ebenfalls nicht verlangsamt. Wurde dagegen die Aktivität der Acyltransferase mit $[^{14}\text{C}]$ -Ölsäure oder $[^{14}\text{C}]$ -Palmitinsäure gemessen, so fand sich, wie die Abbildungen 4 und 5 zeigen, eine Erniedrigung des Umsatzes, die deutlich von der Antikörperkonzentration abhing.

Warum diese Verlangsamung der Acylierung nur bei Verwendung markierter Fettsäuren gemessen wird, kann z. Z. noch nicht befriedigend erklärt werden. Diese Diskrepanz könnte dadurch bedingt sein, daß in antikörperbelegten Zellen nur die Aktivierung der Fettsäuren mit CoA (Ligase-Reaktion) und nicht die Transferase-Reaktion langsamer verläuft. Dies wird z. Z. mit $[^{14}\text{C}]$ -Acyl-CoA geprüft.

Wir danken den med.-technischen Assistentinnen Fr. Ingrid AEHNELT und Fr. Karin ZWETSCHKE für wertvolle Mitarbeit. Die Arbeit wurde z. T. mit Mitteln der Research Corporation, New York, ausgeführt.

¹⁾ Fa. Behring-Werke, Marburg/L.

Literatur

1. KÖGL, F., J. DE GIER, I. MULDER und L. L. M. VAN DEENEN, *Biochim. biophysica Acta* (Amsterdam) **43**, 95 (1960). — 2. VAN DEENEN, L. L. M., J. DE GIER, U. M. T. HOUTSMULLER, A. MONTFORT und E. MULDER in A. C. Frazer: *Biochemical Problems of Lipids*, S. 404, Elsevier, Amsterdam (1963). — 3. MULDER, E., J. DE GIER und L. L. M. VAN DEENEN, *Biochem. biophysica Acta* (Amsterdam) **70**, 94 (1963). — 4. MUNDER, P. G., E. FERBER und H. FISCHER, *Z. Naturforsch.* **20b**, 1048 (1965). — 5. LANDS, W. E. M. und I. MERKL, *J. biol. Chemistry* **238**, 898 (1963). — 6. OLIVEIRA, M. M. und M. VAUGHAN, *Federat. Proc.* **21**, 296 (1962). — 7. HEEMSKERK, C. T. H. und L. L. M. VAN DEENEN, *Kon. Nederl. Acad. Wetensch. Amsterdam, Proc. S. B* **67**, 181 (1964). — 8. FERBER, E., P. G. MUNDER und H. FISCHER, *Biochem. Z.* **344**, 218 (1966). — 9. MARINETTI, G. V., J. ERBLAND und J. KOCHEN, *Federat. Proc.* **16**, 837 (1957). — 10. WANG, C. H. und D. E. JONES, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **1**, 203 (1959). — 11. GEIGER, J. W. und L. B. WRIGHT, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **2**, 282 (1960). — 12. BOUSQUET, W. F. und J. E. CHRISTIAN, *Analytic Chem.* **32**, 722 (1960). — 13. LOFTFIELD, R. B., *Atomlight No.* **13** (1960). — 14. DAVIDSON, E. A., *Packard Technical Bull. No.* **4** (1962). — 15. GERLACH, E., B. DEUTICKE und J. DUHM, *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* **280**, 243 (1964). — 16. DEUTICKE, B. J., DUHM und E. GERLACH, *Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen Tiere* **280**, 275 (1964). — 17. FERBER, E., P. G. MUNDER und H. FISCHER, in Vorbereitung.

Professor Dr. H. Fischer
Max-Planck-Institut für Immunbiologie
78 Freiburg/Br.-Zähringen
Stübeweg